二至丸抑制乳腺癌细胞在骨微环境中的定植及骨破坏的作用及机制研究

李雅婧[1]，陈子超[1]，牛明月[1]，丁佳欣[1]，张　振[1]，郑　昊[2*]

1. 山东中医药大学　中医药创新研究院，山东 济南　250355
2. 临沂市人民医院，山东 临沂　276000

摘　要：目的　探究二至丸调控肿瘤细胞-成骨细胞黏附干预乳腺癌骨内生长的机制。**方法**　采用 MTT 法、细胞划痕实验和结晶紫染色考察二至丸（19.53～5 000.00 μg·mL^{-1}）对 4T1 细胞活力、迁移及增殖的影响。将 4T1-Luc 细胞接种于小鼠胫骨构建乳腺癌骨内生长模型，通过生物发光成像、活体及离体 Micro-CT、生存期和脏器指数评价二至丸（10、5 g·kg^{-1}）的体内药效及安全性，免疫组织化学检测荷瘤胫骨病灶组织中压电型机械敏感离子通道组件 1（Piezo-1）和神经型钙黏蛋白（N-cdh）的表达。采用 Fluo-4 AM 探针检测 4T1 细胞内 Ca^{2+}水平，Western blotting 检测 Piezo-1、磷酸化钙调蛋白依赖性蛋白激酶II（p-CaMKII）、磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白（p-CREB）及 N-cdh 蛋白的表达。构建 4T1 细胞与成骨细胞直接接触共培养模型，通过细胞黏附、免疫荧光共定位和阻断实验评价 N-cdh/钙黏蛋白 11（Cdh-11）介导的细胞间黏附，并采用原子力显微镜（AFM）单细胞力谱技术测定两类细胞间的黏附力和黏附功。**结果**　与对照组比较，二至丸可降低 4T1 细胞活力，抑制其迁移和增殖（P＜0.01、0.001）。体内实验表明，与模型组比较，二至丸干预后小鼠胫骨局部生物发光信号减弱，骨内肿瘤负荷降低，活体及离体骨 CT 显示骨组织破坏趋势减轻，免疫组织化学结果进一步显示，二至丸可降低荷瘤胫骨病灶组织中 Piezo-1 和 N-cdh 的阳性表达（P＜0.01、0.001）；小鼠生存时间延长，且心、肾、脾、肝等脏器指数未见明显异常。细胞分子机制研究表明，二至丸下调 4T1 细胞中 Piezo-1 的表达，减少细胞内 Ca^{2+}水平，降低 p-CaMKII 和 p-CREB 表达，并降低 N-cdh 的表达（P＜0.05、0.01、0.001）。细胞黏附实验、共定位分析、阻断实验表明，二至丸可削弱 N-cdh/Cdh-11 介导的肿瘤细胞与成骨细胞黏附（P＜0.01、0.001）；AFM 单细胞力谱技术进一步证实，二至丸降低两类细胞间黏附力和黏附功（P＜0.001）。**结论**　二至丸可抑制 4T1 乳腺癌细胞活力、迁移和增殖，降低乳腺癌胫骨内肿瘤负荷并减轻骨破坏，上述作用可能与 Piezo-1/Ca^{2+}/CaMKII/CREB/N-cdh 相关信号变化及 N-cdh/Cdh-11 介导的肿瘤细胞-成骨细胞黏附减弱有关。

关键词：二至丸；乳腺癌骨转移；Piezo-1；细胞黏附；骨破坏；原子力显微镜

中图分类号：R965　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 6376(2026)11 - 3853 - 14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.11.005

Research on effect and mechanism of Erzhi Pills in inhibiting colonization of breast cancer cells in bone microenvironment and bone destruction

LI Yajing[1], CHEN Zichao[1], NIU Mingyue[1], DING Jiaxin[1], ZHANG Zhen[1], ZHENG Hao[2]

1. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
2. Linyi City People Hospital, Linyi 276000, China

Abstract: Objective　To investigate how Erzhi Pills inhibits breast cancer growth in bone by regulating adhesion between tumor cells and osteoblasts. **Methods**　MTT assay, wound-healing assay, and crystal violet staining were used to evaluate the effects of Erzhi Pills (19.53—5 000.00 μg·mL^{-1}) on the viability, migration, and proliferation of 4T1 cells. A mouse model of breast cancer growth in bone was established by injecting 4T1-Luc cells into the tibia. Bioluminescence imaging, *in vivo* and *ex vivo* micro-computed tomography (micro-CT), survival analysis, and organ index measurements were used to evaluate the efficacy and safety of Erzhi Pills (10, and 5 g·kg^{-1}) *in vivo*. Immunohistochemistry was used to examine the expression of piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (Piezo-1) and N-cadherin (N-cdh) in tibial tumor lesions. Intracellular Ca^{2+} levels were measured using the Fluo-4 AM

收稿日期：2026-06-30

基金项目：山东省中医药科技项目（M20251207，M20251705）；山东省自然科学基金资助项目（ZR2025MS1285）

作者简介：李雅婧，女，硕士研究生，研究方向为中药药效物质基础与药物创新。E-mail: lyjjj595@163.com

***通信作者：**郑　昊，男，副主任医师，硕士生导师，研究方向为脑病及肿瘤的中西医康复治疗。E-mail: zpm_030@126.com

probe. Western blotting was used to detect the protein levels of Piezo-1, phosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (p-CaMKII), phosphorylated cAMP response element-binding protein (p-CREB), and N-cdh. A direct-contact coculture model of 4T1 cells and osteoblasts was established. Cell adhesion assays, immunofluorescence colocalization, and blocking experiments were used to evaluate cell adhesion mediated by N-cdh/cadherin-11 (Cdh-11). Atomic force microscopy (AFM)-based single-cell force spectroscopy was used to measure the adhesion force and adhesion work between the two cell types. **Results** Erzhi Pills reduced 4T1 cell viability and inhibited cell migration and proliferation ($P < 0.01$, 0.001). *In vivo*, Erzhi Pills reduced the bioluminescence signal in the tibia and decreased the tumor burden in bone. *In vivo* and *ex vivo* micro-CT showed a trend toward reduced bone damage. Immunohistochemistry further showed that Erzhi Pills reduced Piezo-1 and N-cdh expression in tibial tumor lesions ($P < 0.01$, 0.001). Erzhi Pills prolonged mouse survival, while the heart, kidney, spleen, and liver indices showed no obvious abnormalities. Mechanistic experiments showed that Erzhi Pills reduced Piezo-1 expression and intracellular Ca^{2+} levels and decreased p-CaMKII, p-CREB, and N-cdh protein levels in 4T1 cells ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). Cell adhesion, colocalization, and blocking experiments showed that Erzhi Pills weakened N-cdh/Cdh-11-mediated adhesion between tumor cells and osteoblasts ($P < 0.01$, 0.001). AFM-based single-cell force spectroscopy further confirmed that Erzhi Pills reduced the adhesion force and adhesion work between the two cell types ($P < 0.001$). **Conclusion** Erzhi Pills inhibits the viability, migration, and proliferation of 4T1 breast cancer cells, reduces breast cancer growth in the tibia, and alleviates bone damage. These effects may be associated with alterations in Piezo-1/Ca^{2+}/CaMKII/CREB/N-cdh-related signaling and weakened N-cdh/Cdh-11-mediated adhesion between tumor cells and osteoblasts.

Key words: Erzhi Pills; breast cancer bone metastasis; Piezo-1; cell adhesion; bone destruction; atomic force microscopy

乳腺癌骨转移是乳腺癌进展过程中常见且严重的临床问题，可引起顽固性骨痛、病理性骨折、高钙血症和脊髓压迫等骨相关事件，严重影响患者生活质量和生存预后[1]。临床上，部分患者在确诊时已出现骨内病灶或骨破坏。现有治疗虽可在一定程度上缓解症状、延缓骨损伤进展，但仍难以有效阻断肿瘤细胞在骨组织内的持续存活、扩增及其与骨微环境之间的相互作用[2]。骨微环境由成骨细胞、破骨细胞、骨基质及多种细胞因子共同组成，其中乳腺癌细胞与成骨细胞之间的黏附互作有助于肿瘤细胞在骨内定植并促进病灶进展[3]。因此，从已发骨转移状态下的“骨内生长”和“肿瘤细胞-成骨细胞黏附”入手，寻找能够削弱乳腺癌细胞骨内定植和持续生长的干预策略具有重要意义。

在已形成的乳腺癌骨转移病灶中，骨微环境不再只是肿瘤细胞被动停留的场所，而是逐渐转变为支持肿瘤细胞持续存活、扩增和侵袭的特殊生态位。乳腺癌细胞在骨组织内能否长期维持生长，与其和骨微环境细胞之间的黏附互作密切相关[4]。神经型钙黏蛋白（N-cdh）是一种依赖钙离子的黏附分子，在乳腺癌细胞中高表达[5-6]。N-cdh 不仅可介导肿瘤细胞之间的同型黏附[7-8]，还能与成骨细胞上表达的钙黏蛋白 11（Cdh-11）形成异型黏附[9-10]，从而增强乳腺癌细胞与骨微环境之间的稳定连接。Cdh-11 是成骨细胞和骨组织中具有代表性的黏附分子，其在骨微环境中的高表达为乳腺癌细胞表面的 N-cdh 提供了持续结合界面，使肿瘤细胞更容易在骨内病灶中稳定停留，并进一步参与骨溶解和局部侵袭过程[11]。因此，降低 N-cdh 表达、削弱其与 Cdh-11 的黏附，从而阻断转移形成[12]，是限制乳腺癌骨内生长和病灶进展的重要切入点。

N-cdh 的表达及黏附活性与细胞内 Ca^{2+}信号密切相关。细胞内 Ca^{2+}水平升高可激活 Ca^{2+}/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II（CaMKII）/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白（CREB）信号级联[13]，磷酸化 CREB 可参与 N-cdh 转录调控[14]，进而增强肿瘤细胞黏附能力。骨组织具有特殊的力学微环境，已进入骨内的乳腺癌细胞需要不断适应基质硬度、细胞接触和局部机械应力等刺激。压电型机械敏感离子通道组件 1（Piezo-1）作为机械敏感离子通道，是连接外界机械刺激与细胞内 Ca^{2+}信号的重要分子。基于此，本研究推测，乳腺癌细胞进入骨微环境后，Piezo-1 被激活并引起 Ca^{2+}内流，进一步激活 CaMKII/CREB 轴[15]，上调 N-cdh 表达，形成“Piezo-1-Ca^{2+}-CaMKII/CREB-N-cdh”的促黏附通路。在该通路下游，升高的 N-cdh 可与成骨细胞表面的 Cdh-11 形成稳定黏附界面，从而促进乳腺癌细胞在骨内定植。因此，从上游抑制 Piezo-1 介导的 Ca^{2+}信号，并进一步削弱 N-cdh/Cdh-11 黏附轴，可能成为干预乳腺癌骨内生长的重要策略。

二至丸由墨旱莲和女贞子组成，是经典补益肝肾方剂，具有滋阴填精、强筋健骨等功效[16]。中医

认为，骨失所养多与肝肾不足有关，而肿瘤转移进展常伴正气亏虚、瘀毒内蕴及痰瘀互结等病理变化。现代研究显示，墨旱莲和女贞子含有黄酮类、酚酸类、香豆素类及内酯类等多种活性成分[17]，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤及调节骨代谢等作用[18]。因此，本研究选用二至丸作为干预对象，聚焦于乳腺癌骨内生长中肿瘤细胞与成骨细胞的黏附互作，基于“机械敏感离子通道-钙信号-黏附”这一调控模式，探讨二至丸是否能够抑制乳腺癌细胞骨内生长，削弱乳腺癌细胞与成骨细胞之间的黏附，并阐明其对 Piezo-1-Ca^{2+}-CaMKII-CREB/N-cdh 黏附轴的调节作用，以期为干预乳腺癌的骨内生长提供参考。

1　材料

1.1　实验细胞与动物

小鼠乳腺癌细胞 4T1（目录号 SCSP-5056）、萤火虫荧光素酶标记的小鼠乳腺癌细胞 4T1-Luc（目录号 JCRB1447）及小鼠前成骨细胞亚克隆 MC3T3-E1 subclone 14（目录号 SCSP-5037）购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库；成熟成骨细胞由 MC3T3-E1 subclone 14 经成骨诱导分化获得。4T1 和 4T1-Luc 细胞采用 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM）培养；MC3T3-E1 subclone 14 细胞采用 α-最低必需培养基（α-MEM）培养。所有培养基均加入 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素，细胞置于 37 ℃、5% CO_2 湿润培养箱中培养。

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠，6 周龄，体质量 16～18 g，购自济南鹏悦实验动物繁育有限公司，实验动物生产许可证号为 SCXK（鲁）2022-0006。本研究获得山东中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号 SDUTCM20250829001）。

1.2　药材与主要试剂

女贞子和墨旱莲购自济南建联中药店（批号 241101），经山东中医药大学中药教研室鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实、菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L.。

N-cdh 抗体（批号 AF5239）、磷酸化钙调蛋白依赖性蛋白激酶II（p-CaMKII）抗体（批号 AF3493）、磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白（p-CREB）抗体（批号 AF3189）和 Piezo-1 抗体（批号 DF12083）购自 Affinity Biosciences；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体（批号 GB11002）购自 Servicebio 公司；N-cdh 阻断剂 ADH-1（批号 HY-13541）购自 MedChemExpress 公司；Cdh-11 阻断剂 Sd-133（批号 T210508）购自 TargetMol 公司；细胞培养爬片（直径 14 mm，批号 801010）购自无锡 NEST 生命科技有限公司；原子力显微镜（AFM）扫描探针购自德国 Bruker 公司；DMEM（中国 BasalMedia 公司）；α-MEM（美国 Gibco 公司）；10%胎牛血清（中国 Gold Sere 公司）；1%青霉素-链霉素（中国 Beyotime 公司）。

1.3　实验仪器

Axio Imager.A2 型高级正置荧光显微镜（德国卡尔·蔡司股份公司）；LT 7035 型微量分光光度计、Multiskan SkyHigh 型酶标仪、CO_2 湿润培养箱（美国赛默飞世尔科技公司）；PowerPac HC 型蛋白质垂直电泳仪、ChemiDoc XRS＋型凝胶成像仪（美国伯乐实验室公司）；NanoScope 6 型 AFM、Bruker Micro-CT 型小动物骨 CT 扫描仪（德国布鲁克公司）；IVIS Lumina XRMS Series III型小动物活体成像系统（美国 PerkinElmer 公司）。

2　方法

2.1　二至丸的制备

分别取女贞子和墨旱莲各 6 g，粉碎后置于 150 mL 圆底烧瓶中。按料液比 1∶10 加入 70%乙醇溶液，回流提取 3 h。提取液经 8 层纱布滤过后，减压回收乙醇，浓缩至膏状。浓缩液置于−80 ℃预冻过夜后进行冷冻干燥，得到二至丸乙醇提取物粉末[19]。基于高分辨质谱对二至丸中的化学成分进行了系统表征，检测出其组成以黄酮类及酚酸类物质为主，同时检出倍半萜内酯类等活性成分，包括木犀草素、蟛蜞菊内酯等。经 HPLC 检测本研究制备的提取物中蟛蜞菊内酯质量分数为 0.004 4%。

2.2　细胞活力、迁移和增殖实验

2.2.1　MTT 法检测细胞活力　将对数生长期的 4T1 细胞以每孔 6×10^3 个接种于 96 孔板中，每孔 100 μL。细胞贴壁后给予 5 000.00、2 500.00、1 250.00、625.00、312.50、156.25、78.13、39.06、19.53 $\mu g\cdot mL^{-1}$ 的二至丸提取物处理 24 h，对照组不加药，空白组不接种细胞。加入 MTT 溶液孵育 4 h，弃去上清，加入二甲基亚砜溶解甲瓒结晶，采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度（A）值，计算细胞存活率。

$$细胞存活率=(A_{给药}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})$$

2.2.2　划痕实验检测细胞迁移能力　将对数生长期的 4T1 细胞以每孔 6×10^5 个接种于 6 孔板中，待

细胞生长至约 90%融合形成单层细胞时，使用无菌 200 μL 枪头垂直划痕。PBS 轻洗去除脱落细胞后，加入含不同质量浓度（250、500、750、1 000 μg·mL^{-1}）二至丸提取物的无血清培养基培养，对照组不加药。分别于 0、24 h 拍照记录，并计算划痕愈合率。

$$划痕愈合率=(S_0-S_{24\,h})/S_0$$

S_0-0 h 时各组划痕面积；$S_{24\,h}$-24 h 时各组划痕面积

2.2.3 结晶紫实验检测细胞增殖 将对数生长期的 4T1 细胞以每孔 6×10^5 个接种于 6 孔板中，待细胞贴壁并形成约 90%融合单层后，按“2.2.2”项下方法分组、加药处理。固定细胞并进行结晶紫染色，拍照观察细胞增殖情况。

2.3 动物分组、模型建立及给药

小鼠适应性饲养后，采用胫骨骨髓腔注射 4T1-Luc 细胞建立乳腺癌胫骨骨髓腔内接种模型。小鼠麻醉固定后，使用 100 U 胰岛素注射器将 10 μL 4T1-Luc 细胞悬液（2×10^5 个细胞）[20]缓慢注入小鼠胫骨骨髓腔内。造模 7 d 后进行首次小动物活体成像，确认胫骨局部肿瘤信号后开始给药。造模小鼠随机分为模型组、顺铂（阳性药，5 mg·kg^{-1}）组和二至丸高、低剂量（10、5 g·kg^{-1}）组，每组不少于 5 只。二至丸每天 ig 给药 1 次，顺铂按 5 mg·kg^{-1} 每 3 天 ip 1 次，模型组 ig 等体积磷酸盐缓冲液（PBS），连续干预 21 d。实验期间每 7 天进行 1 次活体成像，解剖前 1 d 进行小动物骨 CT 扫描；实验结束后采集胫骨及心、肾、脾、肝等主要脏器，计算脏器指数。

2.4 肿瘤生物发光成像

小鼠 ip D-luciferin 底物［150 mg·kg^{-1}，以杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS）溶解］后，待底物在体内分布 10～20 min，采用 3%异氟烷经小动物麻醉系统进行麻醉。随后将小鼠置于 IVIS 小动物活体成像系统中，采集胫骨局部生物发光信号。各组成像过程中保持相同的曝光时间、成像参数及感兴趣区域（ROI）设置。采用总荧光强度进行定量分析，以评价 4T1-Luc 细胞在胫骨骨髓腔内的生长情况及二至丸干预效果[22]。

2.5 Micro-CT 骨重建分析

实验结束前 1 d 对小鼠进行活体骨 CT 扫描。实验结束后处死小鼠，取肿瘤侧胫骨组织，经 4%多聚甲醛固定后进行离体 Micro-CT 扫描。扫描数据采用 NRecon 软件进行三维重建，采用 Data Viewer 软件进行空间定位，并采用 CTvox 软件进行三维可视化分析。通过比较各组胫骨局部骨结构变化，评价二至丸对乳腺癌骨内生长相关骨破坏的干预作用。

2.6 病灶组织免疫组织化学检测

取各组小鼠荷瘤胫骨组织，经 4%多聚甲醛固定、10% EDTA 脱钙后进行石蜡包埋，连续切片（厚度 4 μm）。切片经脱蜡、水化和抗原修复后，采用 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶，并以山羊血清封闭；分别加入 Piezo-1 和 N-cdh 一抗，4 ℃孵育过夜。PBS 洗涤后加入 HRP 标记的二抗孵育，采用 DAB 显色和苏木精复染，随后脱水、透明并封片。使用显微镜采集图像，采用 Image J 软件计算阳性染色面积，以评价 Piezo-1 和 N-cdh 在病灶组织中的表达水平。

2.7 Western blotting 分析

细胞接种、分组及给药操作同“2.2.2”项，4T1 细胞加药处理 24 h 后提取总蛋白，经 SDS-PAGE 电泳并转膜。封闭后分别加入 Piezo-1、N-cdh、p-CaMKII、p-CREB 及 GAPDH 一抗，孵育并洗膜后加入相应二抗。检测条带，扣除背景后进行灰度分析，以 GAPDH 为内参计算目标蛋白相对表达量。

2.8 细胞-细胞黏附实验

将成骨细胞以每孔 1×10^5 个接种于预包被 0.1%明胶的 24 孔板中，培养至形成稳定单层。另将对数生长期 4T1 细胞以每孔 6×10^5 个的密度接种于 6 孔板，待细胞贴壁后，分别加入质量浓度为 0（对照组）、250、500、750 和 1 000 μg·mL^{-1} 的二至丸提取物，处理 24 h 后，去除含药培养基，消化并收集细胞，制备单细胞悬液。随后按成骨细胞∶4T1 细胞＝3∶1 将 4T1 细胞缓慢接种于成骨细胞单层表面，于 37 ℃孵育 15～30 min。孵育结束后去除上清，用预热培养基或 PBS 轻柔清洗 2 次，去除未黏附细胞，剩余黏附细胞用于后续荧光成像和定量分析。黏附阻断实验中，分别采用 ADH-1（40 μmol·L^{-1}）预处理 4T1 细胞、Sd-133（1 μmol·L^{-1}）预处理成骨细胞，均于 37 ℃孵育 1 h，或同时处理 2 类细胞后再进行共培养，对照组不加药，以加入等体积二甲基亚砜（DMSO）的细胞作为溶媒对照。阻断处理后按上述方法进行细胞黏附实验，并对黏附细胞进行荧光成像和定量分析[23]。

2.9 黏附力和黏附功检测

采用 AFM 单细胞力谱技术检测 4T1 细胞与成骨细胞之间的黏附力和黏附功[24]。将直径 14 mm 的

细胞爬片置于 24 孔板中，将成骨细胞以 5×10^4 个·cm^{-2} 接种于细胞爬片上，培养至融合度达 70%～80%；另将对数生长期 4T1 细胞以每孔 6×10^5 个的密度接种于 6 孔板，待细胞贴壁后，分别加入质量浓度为 0、250、500 和 1 000 μg·mL^{-1} 的二至丸提取物，处理 24 h 后，去除含药培养基，消化并收集细胞，制备单细胞悬液，用于 AFM 单细胞力谱检测。使用无针尖 AFM 悬臂捕获单个 4T1 细胞，并采用热噪声法校准悬臂弹性系数。在恒定加载力条件下，将 4T1 细胞压向成骨细胞并保持接触 5 s，随后回撤并记录力-距离曲线。回撤过程中出现的最大反向力定义为黏附力，回撤阶段曲线下面积定义为黏附功。每组随机选择 30 个 4T1 细胞进行独立测量，所有检测均在 37 ℃、无血清条件下完成[25]。

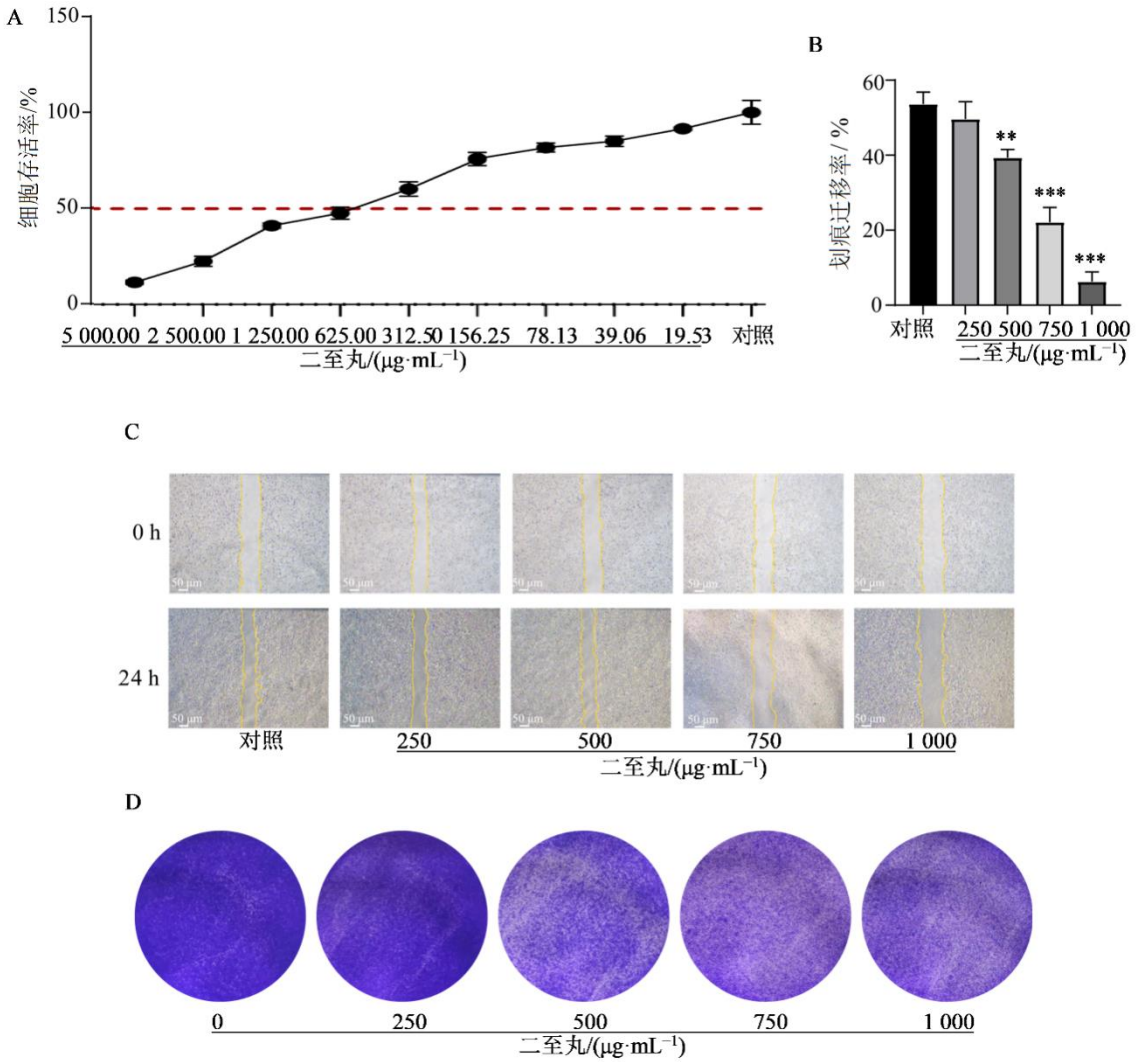
2.10　统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。根据数据的适合性，采用单因素方差分析或双因素方差分析进行统计评估。

3　结果

3.1　二至丸抑制 4T1 乳腺癌细胞活力、迁移和增殖

为评价二至丸对乳腺癌细胞恶性表型的影响，本研究首先采用 MTT 实验检测不同质量浓度二至丸提取物处理后 4T1 细胞活力变化。结果显示（图 1），随着二至丸提取物质量浓度升高，4T1 细胞活



A-MTT 实验检测 4T1 细胞活力；B-划痕愈合实验定量分析；C-划痕愈合代表性图片（×40）；D-结晶紫染色（×40）。与对照组比较：$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$。

A-MTT assay to detect the viability of 4T1 cells; B-quantitative analysis of scratch healing assay; C-representative image of scratch healing (×40); D-crystal violet staining (×40). $^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group.

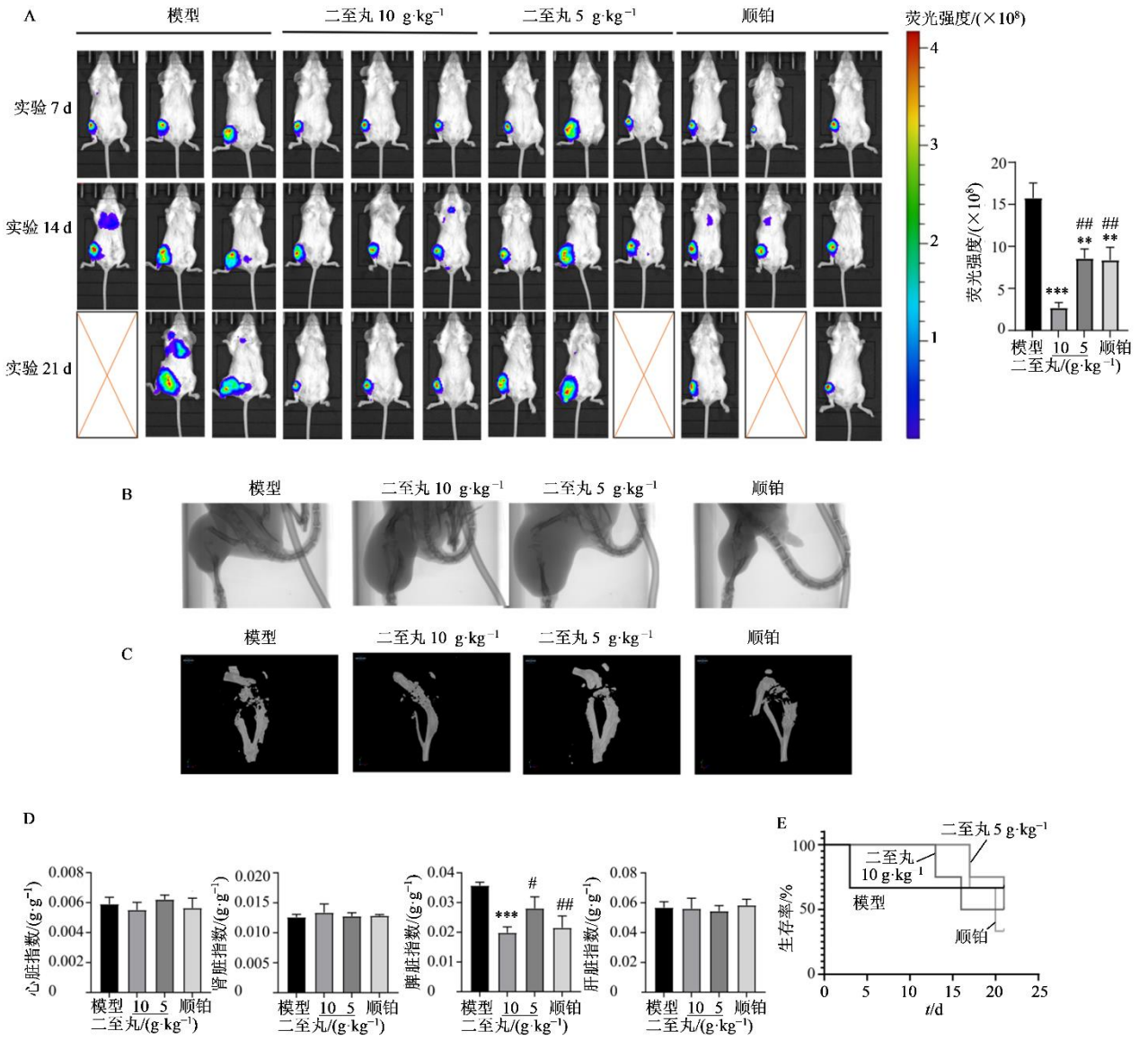
图 1　二至丸对 4T1 细胞活力、迁移及增殖的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

Fig. 1　Effect of Erzhi Pills on viability, migration and proliferation of 4T1 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

力逐渐下降，提示二至丸对 4T1 细胞具有一定抑制作用（图 1-A）。进一步通过划痕愈合实验观察细胞迁移能力，与对照组相比，二至丸处理后划痕愈合速度明显减慢，迁移率显著降低（P＜0.01、0.001），表明二至丸可削弱 4T1 细胞迁移能力（图 1-B、C）。结晶紫染色结果显示，二至丸处理后细胞数量明显减少，密度降低，说明二至丸能够抑制 4T1 细胞增殖（图 1-D）。结果表明，二至丸可从细胞活力、迁移和增殖等方面抑制 4T1 乳腺癌细胞的生长。

3.2 二至丸抑制胫骨内乳腺癌生长并减轻骨破坏

IVIS 活体成像结果显示（图 2-A），与模型组相比，二至丸处理后小鼠胫骨局部生物发光信号减弱，定量分析进一步证实各给药组胫骨局部总荧光强度显著降低（P＜0.01、0.001），且二至丸 10 g·kg^{-1} 效果最显著（P＜0.01），提示二至丸可抑制 4T1-Luc



A-各组小鼠胫骨生物发光 IVIS 成像及荧光总强度定量；B-各组小鼠胫骨体内 Micro-CT 图像；C-各组小鼠荷瘤胫骨离体 Micro-CT 图像；D-各组小鼠心脏、肾脏、脾脏及肝脏脏器指数（n＝3）；E-各组小鼠生存曲线（n＝5）。与模型组比较：$^{**}P$＜0.01 $^{***}P$＜0.001；与二至丸 10 g·kg^{-1} 组比较：$^{\#}P$＜0.05 $^{\#\#}P$＜0.01。

A-IVIS bioluminescence images in tibia of mice from each group and quantitative analysis of total bioluminescence intensity in tibia; B-*In vivo* Micro-CT images of tibial bone structure in mice; C-*Ex vivo* Micro-CT images of tumor-bearing tibiae in mice; D-Organ indexes of the heart, kidney, spleen and liver in each group (n = 3); E-Survival curves of mice in each group (n = 5). $^{**}P$ < 0.01 $^{***}P$ < 0.001 *vs* model group; $^{\#}P$ < 0.05 $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* Erzhi Pills 10 g·kg^{-1} group.

图 2 二至丸抑制乳腺癌细胞在胫骨内生长并减轻骨破坏（$\bar{x}\pm s$）

Fig. 2 Erzhi Pills inhibits growth of breast cancer cells in tibia and reduces bone destruction ($\bar{x}\pm s$)

细胞在胫骨内生长。活体骨 CT 和离体骨 CT 结果显示，模型组小鼠胫骨局部出现明显骨结构破坏，而二至丸干预后骨破坏程度有所减轻，表明二至丸可改善乳腺癌骨内生长相关骨损伤（图 2-B、C）。脏器指数分析显示，与模型组比较，各给药组心、肾、肝指数未见明显变化，二至丸 10 g·kg^{-1} 组脾脏指数明显下降（P＜0.001），提示二至丸在本实验条件下具有较好的体内安全性（图 2-D）。此外，生存曲线结果显示，二至丸干预可延长荷瘤小鼠生存时间（图 2-E）。结果表明，二至丸能够降低乳腺癌骨内肿瘤负荷，减轻胫骨骨破坏，并改善小鼠生存情况。

3.3　二至丸下调 Piezo-1 表达并降低细胞内 Ca^{2+} 内流

为探讨二至丸是否影响乳腺癌细胞对骨微环境机械刺激的响应，本研究围绕机械敏感离子通道 Piezo-1 及其介导的 Ca^{2+} 内流进行检测。机制示意图显示，Piezo-1 可介导 Ca^{2+} 内流，并参与调控乳腺癌细胞在骨微环境中的生物学行为（图 3-A）。Western blotting 结果显示，与对照组比较，二至丸 500、750、1 000 μg·mL^{-1} 处理后 4T1 细胞中 Piezo-1 蛋白表达显著降低（P＜0.01、0.001，图 3-B、C）；免疫荧光检测结果与之一致（图 3-D、G）。Fluo-4 AM 探针检测显示，与对照组比较，二至丸 750、1 000 μg·mL^{-1} 处理后细胞内 Ca^{2+} 荧光强度显著降低（P＜0.001，图 3-E、H）。免疫组织化学结果进一步显示，与模型组相比，二至丸处理组荷瘤胫骨病灶组织中 Piezo-1 阳性染色面积明显降低（图 3-F、I）。结果提示，二至丸干预伴随 4T1 细胞 Piezo-1 表达及细胞内 Ca^{2+} 水平降低，并可下调动物病灶组织中 Piezo-1 的表达。

3.4　二至丸降低 p-CaMKII、p-CREB、N-cdh 蛋白表达

基于二至丸可减弱 Piezo-1 介导的 Ca^{2+} 内流，本研究进一步检测其对 CaMKII/CREB 信号通路及黏附分子 N-cdh 表达的影响。机制示意图显示，Ca^{2+} 信号可通过激活 CaMKII/CREB 通路调控 N-cdh 表达，从而参与乳腺癌细胞黏附过程（图 4-A）。Western blotting 结果显示，二至丸处理后 4T1 细胞中 N-cdh、p-CaMKII 和 p-CREB 蛋白表达水平均明显降低，其中 500、750、1 000 μg·mL^{-1} 组 N-cdh、p-CREB，1 000 μg·mL^{-1} 组 p-CaMKII 差异显著（P＜0.05、0.01、0.001，图 4-B～E）。免疫组织化学结果进一步显示，与模型组相比，各给药组荷瘤胫骨病灶组织中 N-cdh 阳性染色面积明显降低（P＜0.01、0.001，图 4-F、G）。结果表明，二至丸对 N-cdh 表达的调节可能与 CaMKII/CREB 相关信号变化有关。

3.5　二至丸减弱 4T1 细胞与成骨细胞黏附及 N-cdh/Cdh-11 共定位

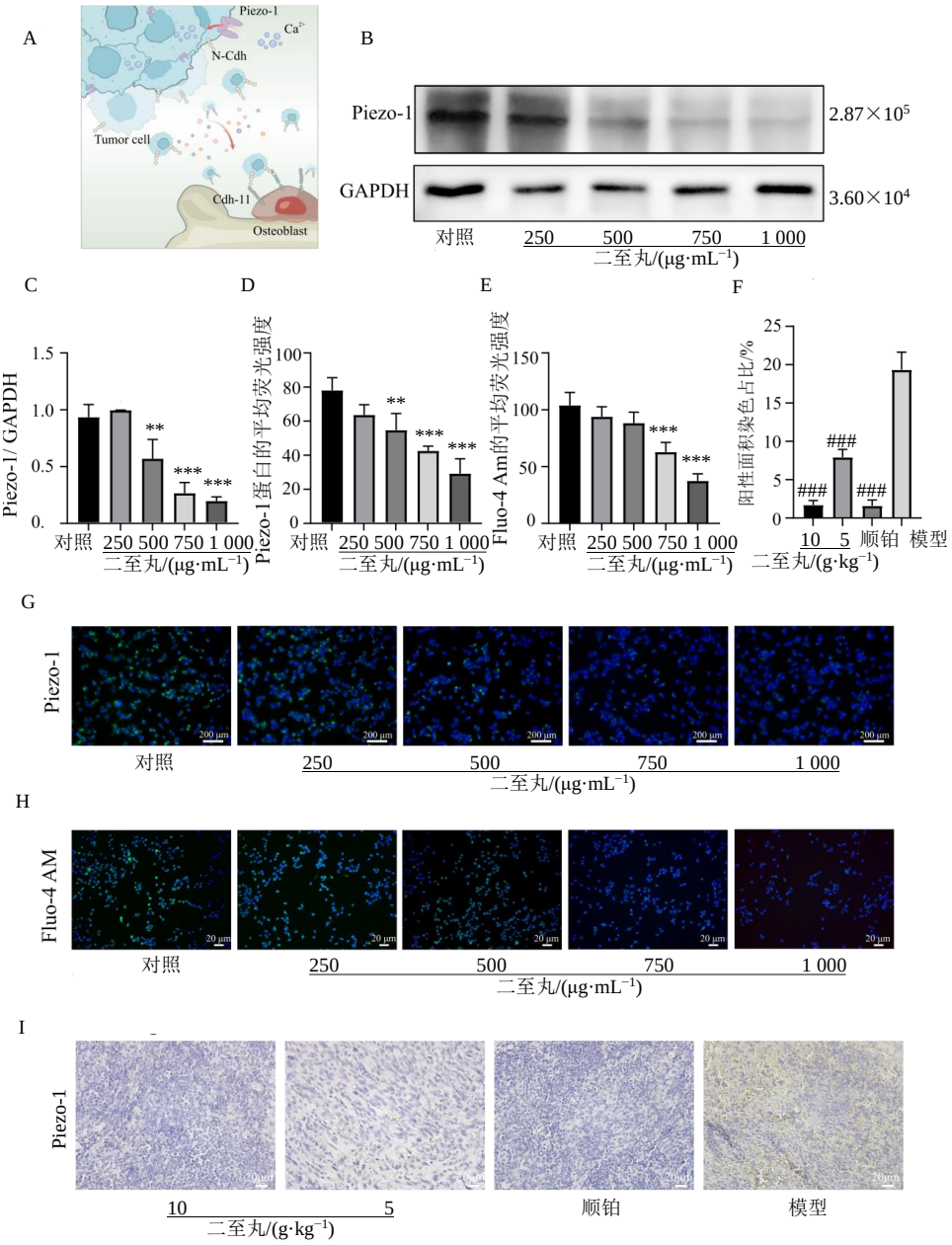
为评价二至丸对 4T1 细胞与成骨细胞功能性黏附的影响，本研究建立二者直接接触共培养模型。细胞黏附结果显示，对照组 4T1 细胞与成骨细胞之间黏附明显，而二至丸处理后黏附细胞数量减少，定量分析结果进一步证实，与对照组比较，二至丸可降低 2 类细胞之间的黏附水平（P＜0.01、0.001，图 5-A、D）。免疫荧光共定位分析显示，与对照组比较，随二至丸浓度的升高，N-cdh 与 Cdh-11 在细胞接触区域共定位信号减弱（P＜0.01、0.001，图 5-B、E）。进一步通过阻断实验验证 N-cdh/Cdh-11 黏附轴的功能发现，阻断 N-cdh 和/或 Cdh-11 后，4T1 细胞与成骨细胞之间的黏附明显减少（P＜0.001，图 5-C、F）。结果表明，二至丸可削弱 N-cdh/Cdh-11 介导的 4T1 细胞与成骨细胞黏附，从而可能干扰乳腺癌细胞在骨微环境中的稳定定植。

3.6　二至丸降低 4T1 细胞与成骨细胞之间的黏附力和黏附功

为从单细胞力学层面进一步验证二至丸对 4T1 细胞-成骨细胞黏附的影响，本研究采用 AFM 单细胞力谱技术检测 4T1 细胞与成骨细胞之间的黏附力和黏附功。AFM 检测示意图展示了单细胞黏附力学测定的基本过程（图 6-A）。结果显示，与对照组相比，二至丸处理后 4T1 细胞与成骨细胞之间的黏附力和黏附功均明显降低（图 6-B、C）。单细胞水平定量分析进一步证实，二至丸可减弱两类细胞之间的初始黏附强度（图 6-D、E）。结果表明，二至丸不仅可调控黏附相关分子表达及共定位，还可从力学层面削弱 4T1 细胞与成骨细胞之间的物理黏附，从而可能干扰乳腺癌细胞在骨微环境中的稳定定植。

4　讨论

乳腺癌细胞在骨内病灶中的持续生长，不仅取决于其自身恶性生物学行为，还与其对骨微环境的适应及其与骨组织细胞的互作密切相关。近期研究显示，肿瘤细胞来源的淋巴毒素-β 可激活成骨细胞并促进肿瘤细胞-成骨细胞黏附及破骨细胞形



A-Piezo-1 介导乳腺癌骨内生长微环境中 Ca^{2+}内流示意图；B-二至丸处理后 4T1 细胞 Piezo-1 蛋白表达的 Western blotting 检测；C-Piezo-1 蛋白表达定量分析；D-Piezo-1 免疫荧光定量分析；E-细胞内 Ca^{2+}荧光强度定量分析；F-病灶组织中 Piezo-1 阳性染色面积占比；G-Piezo-1 免疫荧光染色 (×200)；H-二至丸处理后细胞内 Ca^{2+}的 Fluo-4 AM 荧光染色 (×100)；I-肿瘤组织中 Piezo-1 的免疫组化图 (×100)。与对照组比较：$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#\#\#}P<0.001$。

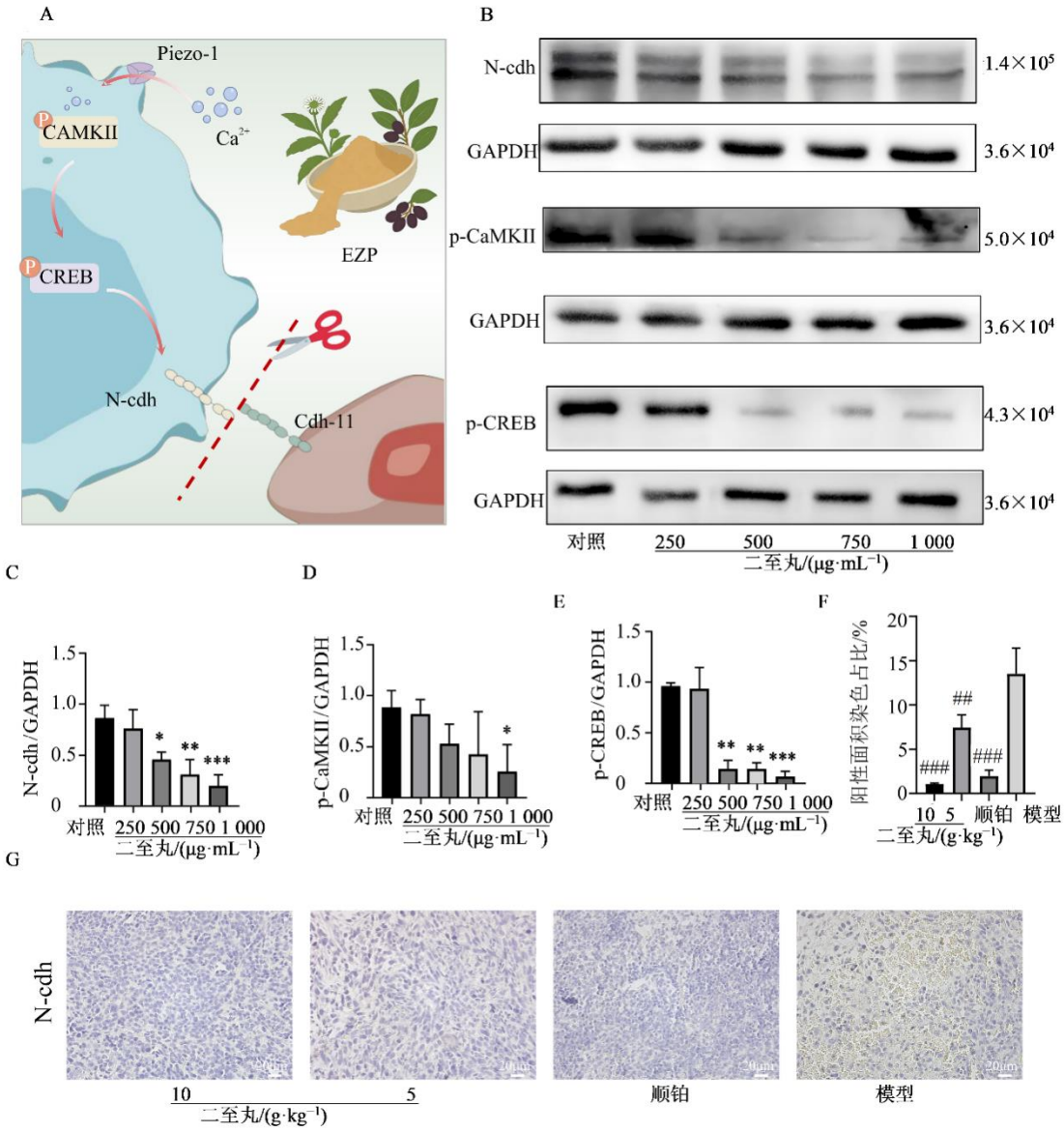
A-schematic diagram of Ca^{2+} influx in the microenvironment of intramedullary growth of breast cancer mediated by Piezo-1; B-Western blotting analysis of Piezo-1 protein expression in 4T1 cells after Erzhi Pills treatment; C-quantitative analysis of Piezo-1 protein expression; D-quantitative analysis of Piezo-1 immunofluorescence; E-quantitative analysis of intracellular Ca^{2+} fluorescence intensity; F-proportion of Piezo-1 positively stained area in the lesion tissue; G-Piezo-1 immunofluorescence staining (×200); H-Fluo-4 AM staining of intracellular Ca^{2+} after Erzhi Pills treatment (×100); I-Immunohistochemical images of Piezo-1 in tumor tissue (×100). $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ *vs* control group; $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* model group.

图 3 二至丸下调 Piezo-1 表达并降低细胞内 Ca^{2+}水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Erzhi Pills downregulates Piezo-1 expression and reduces intracellular Ca^{2+} levels ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

成[26]；另有单细胞研究发现，乳腺癌细胞可诱导骨细胞衰老及促破骨性分泌表型，进而加重骨破坏[27]。这些研究提示，骨内定植是肿瘤细胞与骨微环境细胞共同驱动的动态过程，也为从细胞黏附及力学适应角度干预乳腺癌骨内生长提供了依据。

二至丸作为经典补益肝肾方剂，具有“滋阴填



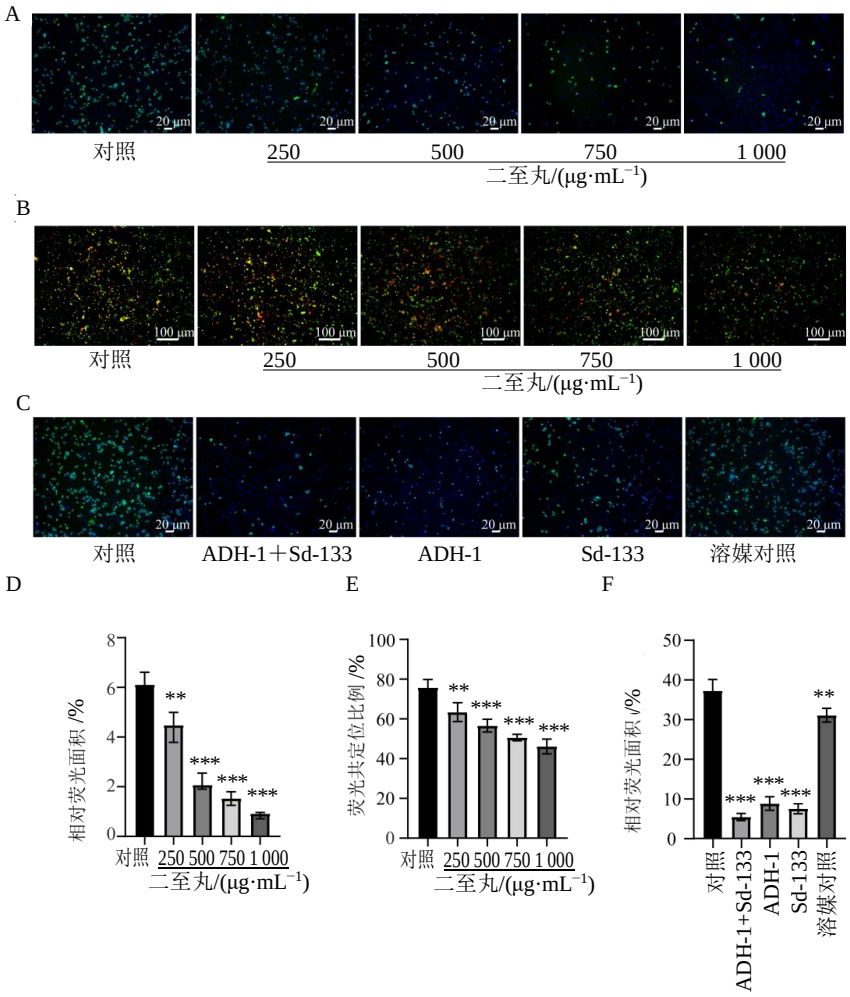
A-Piezo-1/Ca^{2+}/CaMKII/CREB/N-cdh 相关信号及细胞黏附的研究假设示意图；B～E-二至丸处理后 4T1 细胞 N-cdh、p-CaMKII、p-CREB 蛋白表达的 Western blotting 检测及定量分析；F-病灶组织中 N-cdh 阳性染色面积占比；G-肿瘤组织中 N-cdh 的免疫组化图（×100）。与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$。

A-schematic illustration of the proposed Piezo-1/Ca^{2+}/CaMKII/CREB/N-cdh-related signaling and cell adhesion; B-E-Western blotting analysis and quantitative analysis of N-cdh, p-CaMKII and p-CREB in 4T1 cells after Erzhi Pills treatment. F-proportion of N-cdh positively stained area in the lesion tissue; G-immunohistochemical images of N-cdh in tumor tissue (×100). $^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group; $^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* model group.

图 4　二至丸降低 p-CaMKII、p-CREB 及 N-cdh 蛋白表达（$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

Fig. 4　Erzhi Pills reduces expression of p-CaMKII, p-CREB and N-cdh ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

精、强筋健骨”的传统应用基础，同时具备中药复方多成分、多环节调控的特点[16]。本课题组从二至丸中鉴定出木犀草素、槲皮素、蜕皮甾酮、对香豆酸及咖啡酰奎宁酸类等多种潜在活性成分。已有研究表明，蜕皮甾酮可抑制 4T1 细胞增殖、迁移和侵袭，并减弱乳腺癌细胞诱导的破骨细胞分化及骨吸收[28-29]；木犀草素、槲皮素、对香豆酸和咖啡酰奎宁酸类成分亦具有抑制乳腺癌细胞恶性表型、调节 Ca^{2+} 信号或改善骨细胞失衡的作用[30-35]。上述研究提示，这些成分可能共同构成二至丸抑制乳腺癌骨内生长和减轻骨破坏的候选药效物质基础。



A-二至丸处理后 4T1 细胞与成骨细胞直接共培养黏附代表性图像（×100）；B-二至丸处理后 4T1 细胞与成骨细胞直接共培养体系中 N-cdh 与 Cdh-11 免疫荧光共定位图像（×200）；C-阻断处理后细胞黏附免疫荧光图像（×100）；D-二至丸处理后 4T1 细胞与成骨细胞直接共培养黏附定量分析；E-N-cdh 与 Cdh-11 共定位比例分析；F-阻断处理后细胞黏附定量分析。与对照组比较：$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$。

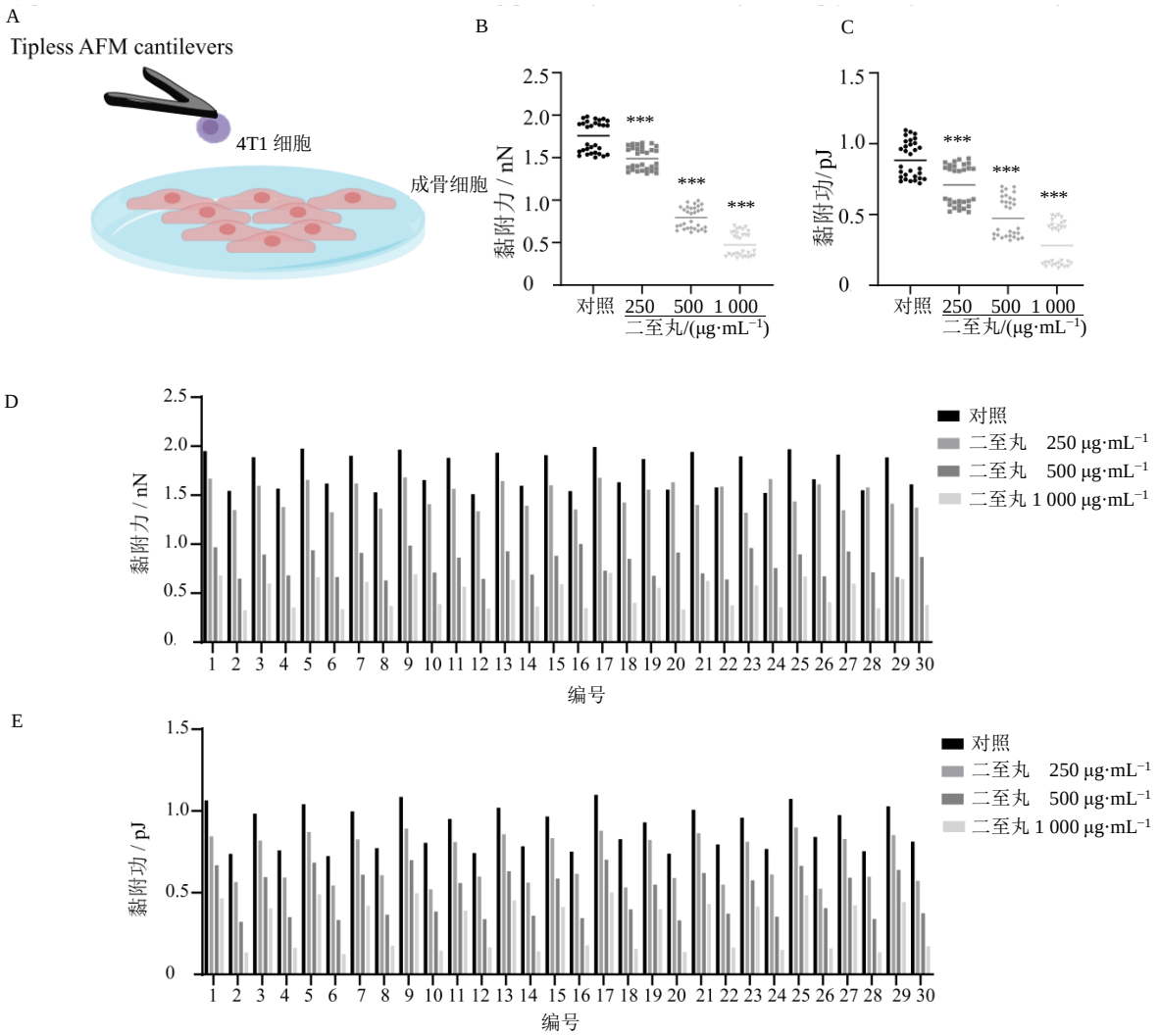
A-representative images of cell adhesion after direct co-culture of 4T1 cells and osteoblasts with Erzhi Pills treatment (×100); B-immunofluorescence colocalization images of N-cdh and Cdh-11 in the direct co-culture system of osteoblasts and 4T1 cells after Erzhi Pills treatment (×200); C-immunofluorescence images of cell adhesion after blocking treatment (×100); D-quantitative analysis of cell adhesion after direct co-culture of 4T1 cells and osteoblasts with Erzhi Pills treatment; E-N-cdh and Cdh-11 colocalization ratio analysis; F-quantitative analysis of cell adhesion after blocking treatment. $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ *vs* control group.

图 5 二至丸减弱 4T1 细胞与成骨细胞黏附及 N-cdh/Cdh-11 共定位（$\bar{x} \pm s$, $n=3$）

Fig. 5 Erzhi Pills reduces adhesion between 4T1 cells and osteoblasts and decreases N-cdh/Cdh-11 colocalization ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

本研究结果显示，二至丸可抑制 4T1 细胞活力、迁移和增殖，并在乳腺癌胫骨骨内生长模型中降低局部肿瘤负荷、减轻骨结构破坏和延长小鼠生存时间，且主要脏器指数未见明显异常。与以往主要关注单一肿瘤表型或破骨过程的天然产物研究相比，本研究从肿瘤细胞恶性表型、骨内肿瘤负荷及骨结构变化等层面评价了二至丸的综合作用，为其干预乳腺癌骨内生长提供了较为完整的药效依据。

骨组织具有特殊的力学微环境，乳腺癌细胞需要适应基质硬度、空间压缩及细胞接触等机械刺激。已有研究表明，机械压缩可通过激活 Piezo-1 介导 Ca^{2+}内流，增强 MDA-MB-231 和 4T1 细胞的基质降解及侵袭能力[36]。近期研究进一步发现，细胞几何形态和上皮-间质可塑性与 Piezo-1 介导的 Ca^{2+}信号密切相关[37]。本研究观察到二至丸干预后 4T1 细胞 Piezo-1 表达及 Ca^{2+}荧光强度降低，动物荷瘤胫骨病灶组织中 Piezo-1 阳性表达亦相应下降，与



A-AFM 检测细胞-细胞黏附示意图；B、C-不同组间细胞黏附力和黏附功检测结果；D、E-单细胞黏附力和黏附功定量分析。与对照组比较：$^{***}P<0.001$。

A-schematic diagram of cell-cell adhesion detection by AFM; B and C-adhesion force and adhesion work in different groups; D and E-quantitative analysis of single-cell adhesion force and adhesion work. $^{***}P < 0.001$ *vs* control group.

图 6　二至丸降低 4T1 细胞与成骨细胞间的黏附力和黏附功（$\bar{x}$ ±*s*, *n*＝30）

Fig. 6　Erzhi Pills reduces adhesion force and adhesion work between 4T1 cells and osteoblasts ($\bar{x}$ ±*s*, *n*＝30)

上述机械感受研究在作用方向上相互印证，并将 Piezo-1 相关机械信号研究进一步拓展至中药复方干预乳腺癌骨内生长的情境。

进一步研究显示，二至丸干预伴随 p-CaMKII、p-CREB 和 N-cdh 表达下降，动物病灶组织中 N-cdh 阳性表达亦降低。N-cdh/Cdh-11 介导的异型黏附有助于乳腺癌细胞与成骨细胞形成稳定连接[11]，而阻断实验和共定位分析支持该黏附轴参与两类细胞互作。本研究进一步采用 AFM 单细胞力谱技术，直接测定二至丸干预后肿瘤细胞-成骨细胞黏附力和黏附功的变化，从分子表达、细胞功能及单细胞力学层面形成相互支持的证据。

二至丸抑制乳腺癌骨内生长和减轻骨破坏的作用，可能与调节 Piezo-1-Ca^{2+}-CaMKII-CREB/N-cdh 相关信号，并削弱 N-cdh/Cdh-11 介导的肿瘤细胞-成骨细胞黏附有关（图 7）。本研究将中药复方干预、机械敏感离子通道、异型细胞黏附及 AFM 单细胞力学检测相结合，为认识二至丸干预乳腺癌骨内生长的潜在机制提供了新的实验依据。但本研究尚缺乏 Piezo-1 功能获得、缺失及救援实验，也有待结合 HE 染色、Ki-67 及骨代谢相关组织学检测进一步验证肿瘤增殖和骨破坏情况。

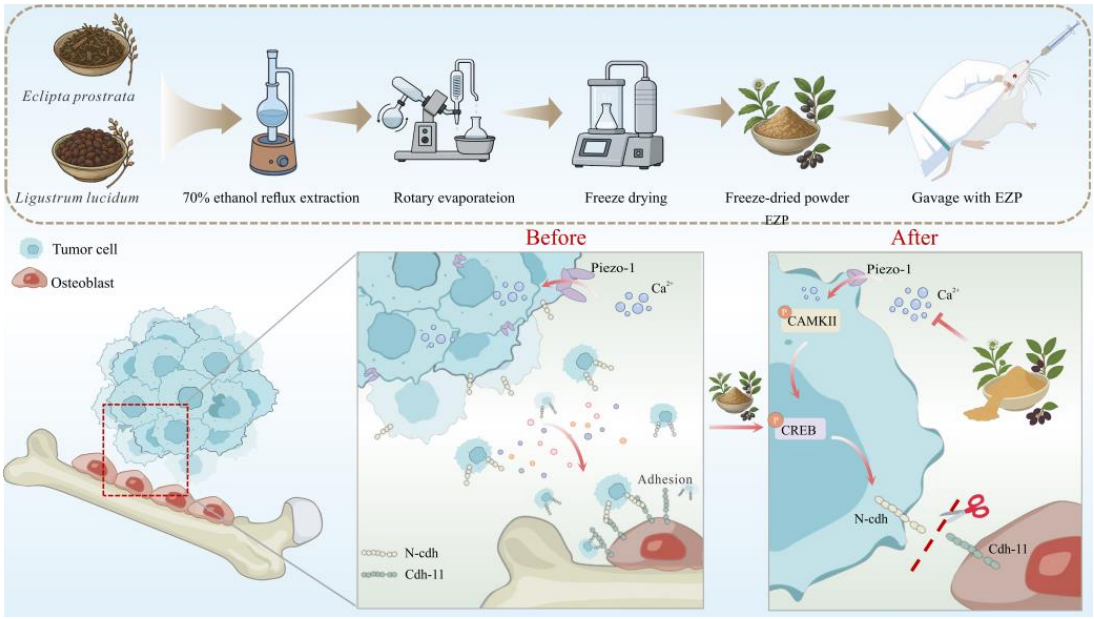


图 7 二至丸调控肿瘤细胞-成骨细胞黏附干预乳腺癌骨内生长的机制

Fig. 7 Mechanism of Erzhi Pills in regulating tumor cell-osteoblast adhesion to inhibit bone metastasis in breast cancer

作者贡献：李雅婧负责整体实验、分析数据和撰写手稿；陈子超、牛明月和丁佳欣协助手稿修改；张振负责实验方案设计、手稿修改及提供研究经费；郑昊负责实验方案设计、实验指导、手稿修改及提供研究经费。所有作者都阅读了手稿的最终版本。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Nolan E, Kang Y B, Malanchi I. Mechanisms of organ-specific metastasis of breast cancer [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2023, 13(11): a041326.

[2] Coleman R, Hadji P, Body J J, et al. Bone health in cancer: ESMO clinical practice guidelines [J]. Ann Oncol, 2020, 31(12): 1650-1663.

[3] Jackett K N, Browne A T, Aber E R, et al. How the bone microenvironment shapes the pre-metastatic niche and metastasis [J]. Nat Cancer, 2024, 5(12): 1800-1814.

[4] Wang H, Yu C J, Gao X, et al. The osteogenic niche promotes early-stage bone colonization of disseminated breast cancer cells [J]. Cancer Cell, 2015, 27(2): 193-210.

[5] Mrozik K M, Blaschuk O W, Cheong C M, et al. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 939.

[6] Hazan R B, Kang L, Whooley B P, et al. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma [J]. Cell Adhes Commun, 1997, 4(6): 399-411.

[7] Groen R W J, de Rooij M F M, Kocemba K A, et al. N-cadherin-mediated interaction with multiple myeloma cells inhibits osteoblast differentiation [J]. Haematologica, 2011, 96(11): 1653-1661.

[8] Nguyen T, Duchesne L, Sankara Narayana G H N, et al. Enhanced cell-cell contact stability and decreased N-cadherin-mediated migration upon fibroblast growth factor receptor-N-cadherin cross talk [J]. Oncogene, 2019, 38(35): 6283-6300.

[9] Kang Y, Meng L A, Bai S, et al. Extracellular vesicles: The “Trojan Horse” within breast cancer host microenvironments [J]. Mol Cancer, 2025, 24(1): 183.

[10] Chu K, Cheng C J, Ye X C, et al. Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(8): 1259-1267.

[11] Li X Q, Zhang R, Lu H, et al. Extracellular vesicle-packaged CDH11 and ITGA5 induce the premetastatic niche for bone colonization of breast cancer cells [J]. Cancer Res, 2022, 82(8): 1560-1574.

[12] Lorusso G, Rüegg C. New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis [J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(3): 226-233.

[13] Nakamura K, Kamouchi M, Arimura K, et al. Extracellular acidification activates cAMP responsive element binding protein via Na^+/H^+ exchanger isoform 1-mediated Ca^{2+} oscillation in central nervous system pericytes [J].

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(11): 2670-2677.

[14] Li Y G, Patterson M R, Morgan E L, et al. CREB1 activation promotes human papillomavirus oncogene expression and cervical cancer cell transformation [J]. J Med Virol, 2023, 95(8): e29025.

[15] Zhang J J, Li J H, Hou Y Q, et al. Osr2 functions as a biomechanical checkpoint to aggravate $CD8^+$ T cell exhaustion in tumor [J]. Cell, 2024, 187(13): 3409-3426.e24.

[16] 蔡芳燕, 刘凌, 陈丽梅, 等. 二至丸功效主治、临床运用及药理作用机制研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊, 2025: 1-16. https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250926.1810.008.
Cai F Y, Liu L, Chen L M, et al. Research progress on the efficacy, clinical application and pharmacological mechanism of Erzhi Pills [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2025: 1-16. https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250926.1810.008.

[17] 吉秀家, 王艳波, 李芳, 等. “女贞子-墨旱莲”药对主要活性成分的网络药理学研究 [J]. 中国当代医药, 2020, 27(12): 12-15, F0004.
Ji X J, Wang Y B, Li F, et al. Research on main active components of “*Fructus Ligustri Lucidi-Ecliptae Herba*” drug pair based on network pharmacology [J]. China Mod Med, 2020, 27(12): 12-15, F0004.

[18] 李彦赟, 孙传腾, 贺凌飞, 等. 二至丸药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(9): 1922-1928.
Li Y Y, Sun C T, He L F, et al. Research progress on pharmacological effects of Erzhi Pill [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(9): 1922-1928.

[19] Hong S W, Wang Y F, Chen Y J, et al. Integrative pharmacology reveals the mechanisms of Erzhi Pills, A traditional Chinese formulation, stimulating melanogenesis [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 324: 117617.

[20] Li B H, Chen Z C, Zhang Z Y, et al. Zuogui pill disrupt the malignant cycle in breast cancer bone metastasis through the Piezo1-Notch-1-GPX4 pathway and active molecules fishing [J]. Phytomedicine, 2024, 123: 155257.

[21] 葛娴, 赵洪婷, 陈利, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 技术分析加味二妙方的活性成分与代谢产物 [J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(8): 998-1010.
Ge X, Zhao H T, Chen L, et al. Analysis of active components and metabolites of modified Ermiao decoction based on UPLC-Q-exactive orbitrap-MS/MS technology [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2025, 41(8): 998-1010.

[22] Huang Y J, Guan Z L, Dai X L, et al. Engineered macrophages as near-infrared light activated drug vectors for chemo-photodynamic therapy of primary and bone metastatic breast cancer [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4310.

[23] Singh R, Choi B K. A transient transfection-based cell adhesion assay with 293T cells [J]. Bio Protoc, 2021, 11(1): e3878.

[24] Müller D J, Dumitru A C, Lo Giudice C, et al. Atomic force microscopy-based force spectroscopy and multiparametric imaging of biomolecular and cellular systems [J]. Chem Rev, 2021, 121(19): 11701-11725.

[25] Huber M, Casares-Arias J, Fässler R, et al. In mitosis integrins reduce adhesion to extracellular matrix and strengthen adhesion to adjacent cells [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2143.

[26] Wang X X, Zhang T J, Zheng B X, et al. Lymphotoxin-β promotes breast cancer bone metastasis colonization and osteolytic outgrowth [J]. Nat Cell Biol, 2024, 26(9): 1597-1612.

[27] Kaur J, Adhikari M, Sabol H M, et al. Single-cell transcriptomic analysis identifies senescent osteocytes that trigger bone destruction in breast cancer metastasis [J]. Cancer Res, 2024, 84(23): 3936-3952.

[28] Li H, Hou M T, Zhang P, et al. Wedelolactone suppresses breast cancer growth and metastasis via regulating TGF-β1/Smad signaling pathway [J]. J Pharm Pharmacol, 2024, 76(8): 1038-1050.

[29] Hsieh C J, Kuo P L, Hou M F, et al. Wedelolactone inhibits breast cancer-induced osteoclastogenesis by decreasing Akt/mTOR signaling [J]. Int J Oncol, 2015, 46(2): 555-562.

[30] Cao D, Zhu G Y, Lu Y, et al. Luteolin suppresses epithelial-mesenchymal transition and migration of triple-negative breast cancer cells by inhibiting YAP/TAZ activity [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110462.

[31] Devipriya S, Vani G, Ramamurthy N, et al. Regulation of intracellular calcium levels and urokinase activity in MDA MB 231 cells by quercetin [J]. Chemotherapy, 2006, 52(2): 60-65.

[32] Woo J T, Nakagawa H, Notoya M, et al. Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and activation of osteoclasts [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(4): 504-509.

[33] Yamaguchi M, Murata T, Shoji M, et al. The flavonoid p-hydroxycinnamic acid mediates anticancer effects on MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro: Implications for suppression of bone metastases [J]. Int J Oncol, 2015, 47(4): 1563-1571.

[34] Zeng A Q, Liang X, Zhu S M, et al. Chlorogenic acid induces apoptosis, inhibits metastasis and improves antitumor immunity in breast cancer via the NF-κB signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2021, 45(2): 717-727.

[35] Kwak S C, Lee C, Kim J Y, et al. Chlorogenic acid inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by down-regulation of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-induced nuclear factor of activated T cells c1 expression [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(11): 1779-1786.

[36] Luo M Z, Cai G, Ho K K Y, et al. Compression enhances invasive phenotype and matrix degradation of breast Cancer cells via Piezo1 activation [J]. BMC Mol Cell Biol, 2022, 23(1): 1.

[37] So C L, Robitaille M, Sadras F, et al. Cellular geometry and epithelial-mesenchymal plasticity intersect with PIEZO1 in breast cancer cells [J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 467.

[责任编辑 兰新新]